

Trakya İlkeren ve Flame Seedless üzüm çeşitlerinde farklı kolhisin dozları kullanılarak poliploidi oluşturma olanakları*

Hatice BİLİR EKBİÇ¹, Semih TANGOLAR²

¹Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, ORDU

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, ADANA

* Bu çalışma Çukurova Üniversitesinde tamamlanmış doktora çalışmasının bir kısmını içermekte olup Ç.Ü. BAP kurumu tarafından da desteklenmiştir.

Alınış tarihi: 13 Haziran 2016, Kabul tarihi: 15 Aralık 2016

Sorumlu yazar: Hatice BİLİR EKBİÇ, e-posta:haticebilirekbic@gmail.com

Öz

Çalışma, Trakya İlkeren ve Flame Seedless çeşitlerinde, *in vivo* denemeleriyle poliploidinin oluşturulmasını sağlayan en uygun kolhisin dozu, uygulama süresi ve şeklinin araştırılması amacıyla Çukurova Üniversitesine bağlı Bağcılık Araştırma ve Uygulama alanında yürütülmüştür. Kolhisin uygulamasında; sürgün uçları 0.5, 0.75 ve %1'lik kolhisin çözeltisine batırılmış pamuklara sarılarak 1, 3 ve 5 gün süreyle tutulmuştur. *In vivo* kolhisin denemesinde Trakya İlkeren çeşidinde %1; Flame Seedless çeşidinde ise %0,75 ve %1 kolhisin dozları sürgün uçlarının tamamının kurumasına neden olmuştur. Her iki çeşit için uygulama yapılmış sürgünlerde canlı sürgün ucu oranı %0,5'lik kolhisin dozunun 1 ve 3 günlük sürelerle uygulanmasından elde edilmiştir. Trakya İlkeren çeşidinde %0,75'lik dozun 3 ve 5 gün süreyle uygulanmasında ise canlılık oranının %50'nin altına düştüğü gözlenmiştir. Kolhisin uygulama doz ve sürelerinin artışına bağlı olarak her iki çeşitte yaprak alanı ve sürgün uzunluğu değerlerinde ve stoma sayısında azalma, stoma genişliği ve uzunluğunda artış saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Asma, mutasyon, kolhisin, poliploidi

Possibilities to generate polyploidy using different colchicine doses in Trakya İlkeren and Flame Seedless grape cultivars

Abstract

The study was carried out in Trakya İlkeren and Flame Seedless grape cultivars to experiment the optimum doses, duration and application method of colchicine at Research and Application vineyard of Cukurova University. In the colchicine experiment, control (distilled water), 0.5%, 0.75% and 1% of colchicine doses were applied using soaked cotton by colchicine solutions to the shoot tips during 1, 3 and 5 days. The 1% colchicine dose in Trakya İlkeren and 0.75% and 1% doses in Flame Seedless caused the desiccation in shoot tips in the *in vivo* colchicine treatments. In both cultivars 1 and 3 days duration of 0.5% colchicine treatment gave the most similar results to the control in terms of alive shoot tip. Vitality rates decreased below 50% in Trakya İlkeren by 3 and 5 days treatments of alive shoot tip. Vitality rates decreased below 50% in Trakya İlkeren by 3 and 5 days treatments of 0.75% colchicine application dose. Depending on the colchicine dose and duration, leaf area, shoot length and stomata density values decreased and stomata dimension increased in both cultivars.

Key words: Grape, mutation, colchicine, polyploidy

Giriş

Meyve türlerinde olduğu gibi asmalarda da iki tip mutasyon tercih edilmektedir. Bunlardan biri omca ya da salkımın bazı karakterlerini etkileyen gen farklılıklarının oluşturulması diğeri ise ploidi düzeyinin değiştirilmesidir. Poliploidi ıslahında, bir ya da daha fazla sayıda kromozom setine sahip bitkilerin elde edilmesi amaçlanmaktadır. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısıyla replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Köksal, 1999).

Asmada değişik yollarla elde edilebilen poliploid bitkilerin gövdeleri daha kalın, yaprakları geniş ve koyu renkli; kökleri ise güçlü ve diploidlere göre daha geniş bir alana yayılım gösterdiği; çiçek, polen ve tohumlarının ise diploidlere göre daha iri olduğu saptanmıştır (Motosugi ve ark., 2002). Ayrıca sıra içeriklerinin de daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Özellikle tetraploid asmalar, tane ve salkım iriliğinin yüksek olması nedeniyle (Luo ve ark., 1995; Notsuka ve ark., 2000) üzüm ıslahında önemli yer tutmaktadır. Tetraploid olan sofralık üzüm çeşitlerinin yetiştiriciliği özellikle Japonya'da yoğun olarak yapılmaktadır. Bu ülkede *V. vinifera* x *V. labruscana* Bailey melezlenmesi sonucu oluşan Kyoho ve Pione çeşitleri toplam bağ alanlarının %40'ını kaplamaktadır (Motosugi ve ark., 2002). Japonya' da geleneksel olarak kullanılan tetraploid çeşitler somatik mutasyonla oluşmuştur. Ancak mevcut çeşitlerin verimlerinin düşüklüğü, zayıf gelişimi ve sürgünlerinin kırılma olma nedeniyle mevcut tetraploid çeşitlerden farklı olarak yeni tetraploid çeşitlerin ıslahına yönelim bulunmaktadır. Aki Queen (Kyoho x Kyoho), Fujiminori (Ikawa 682 x Pione), çeşitleri de bu ülkede ıslah edilen diğeri yeni tetraploid çeşitlerdendir (Park ve ark., 2002). Tetraploid üzüm ıslahına yönelik çalışmaların Çin, Japonya ve Amerika'da yoğunlaşmıştır. Bu ülkelerde yapılan çalışmalarda tetraploid bitki eldesi için uygun kolhisin dozu ve süresinin incelenmektedir (Yamane ve Kudhara, 1980; Luo ve ark., 1995; Notsuka ve ark., 2000; Motosugi ve Motioka, 2001; Motosugi ve ark., 2002; Aihong ve ark., 2005).

Kolhisin; güz çiğdeminin (*Colchicum autumnale* L.) köklerinden elde edilen alkaloid yapılı, renksiz kuvvetli bir zehirdir. Alkol, kloroform ve soğuk suda eriyen; sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir

(Köksal, 1999). Yapılan çalışmalarda kolhisin ve diğeri mutagenlerin etkilerinin incelenmesinde daha çok aktif sürgün uçları ve odun çelikleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı bir adet çekirdekli (Trakya İlkeren) ve bir adette çekirdeksiz (Flame Seedless) toplam iki üzüm çeşidinde, *in vivo* denemeleriyle poliploid oluşturulmasına neden olabilecek en uygun kolhisin dozu, uygulama süresi ve şeklinin belirlenmesidir.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışma 2 yıl süreyle Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bağcılık Araştırma alanı ve Bahçe Bitkileri Bölümü Sitoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Kolhisin (Sigma, C-3915) steril saf su ile seyreltilerek %0,5, %0,75 ve %1'lik çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltiler steril pamuklara emdirilerek çeşitlere ait sürgün uçlarına yerleştirilmiş ve üzeri alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Sürgün uçları bu şekilde 1, 3 ve 5'er gün bekletilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *In vivo* koşullarda sürgün uçlarına kolhisin uygulaması

1 gün süreyle kolhisinde bekletme uygulamasında gün sonunda pamuklar çıkarılıp sürgün uçları saf su ile 3'er defa yıkanmıştır. 3 ve 5'er günlük sürelerle kolhisinde bekletme uygulamalarında ise pamuklar

her gün çıkarılıp sürgün uçları saf su ile yıkanmıştır. Sonrasında kolhisin çözeltisine yeniden batırılan pamuklar ile sürgün uçları sarılmış ve alüminyum folyo ile yeniden kapatılmıştır. Bu uygulamalarda kolhisin emdirilen pamuklar günlük olarak değiştirilmiştir. Bitkilere kolhisin uygulaması havanın nispeten serin olduğu sabah veya akşam saatlerinde yapılmıştır.

Sürgün ucu canlılık oranları (%), aşağıda belirtilen eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır.

$$SUCO = \left[\frac{CSUS}{TSUS} \right] \times 100$$

Eşitlikte; SUCO: Sürgün ucu canlılık oranı (%), CSUS: Canlı sürgün ucu sayısı, TSUS: Toplam sürgün ucu sayısı

Yaprak alanı (cm²), planimetre (KOIZUMI-KP-90N) ile belirlenmiştir. Sürgün uzunluğu (cm), 5 metrelik şerit metre ile ölçülmüştür. Stoma sayısı (adet/mm²), stoma genişliği ve uzunluğu (µm) Akal (2001)'e göre belirlenmiştir. Ploidi analizi, Flow sitometri yoluyla Partec PAI ploidi analizleme cihazı kullanılarak yapılmıştır (De Schepper ve ark., 2001).

Çalışma 3 farklı kolhisin dozu (%0.5, %0.75 ve %1), 3 farklı süre (1, 3 ve 5 gün), 3 tekrür ve her tekrürde 10 bitki olacak şekilde bölünmüş parseller deneme desenine göre dizayn edilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılmasında LSD 0.05 testinden yararlanılmıştır. Çalışmada her çeşit kendi içerisinde değerlendirilmiştir.

Bulgular

Farklı dozlarda ve sürelerde Kolhisin uygulaması yapılmış Trakya İlkeren ve Flame Seedless üzüm çeşitlerine ait canlı sürgün ucu oranları Çizelge 1'de;

Çizelge 1. Trakya İlkeren ve Flame Seedless Çeşitlerinde Kolhisin Uygulamasının Canlı Sürgün Ucu Oranı Üzerine Etkisi (%)

Doz (%)	1. Gün		3. Gün		5. Gün		Ortalama	
	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless
0	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
0.5	100.0a	100.0a	100.0a	93.3a	66.7c	66.7b	88.9b	86.7b
0.75	76.7b	0c	40.0d	0c	23.3e	0c	46.7c	0c
1	0f	0c	0f	0c	0f	0c	0d	0c
Ortalama	69.2 a	50.0a	60.0b	48.3a	47.5c	41.7b		

LSD % 5 (Doz, Trakya İlkeren): 4.0
LSD % 5 (Doz x Süre, Trakya İlkeren): 6.9
LSD % 5 (Süre, Flame Seedless): 3.8
LSD % 5 (Süre, Trakya İlkeren): 3.4
LSD % 5 (Doz, Flame Seedless): 4.3
LSD % 5 (Doz x Süre, Flame Seedless): 7.4

yaprak alanı Çizelge 2'de; sürgün uzunluğu Çizelge 3'de; stoma sayısı Çizelge 4'de; stoma genişliği Çizelge 5'de; stoma uzunluğu Çizelge 6'da verilmiştir.

Uygulamaların canlı sürgün ucu oranı üzerine etkisine bakıldığında; her iki çeşit içinde kontrol uygulaması dışındaki kolhisin dozları arasında en yüksek canlılık oranı % 0.5 dozundan elde edilmiştir (Trakya İlkeren: % 88.9, Flame Seedless: % 86.7). Canlı sürgün ucu oranı bakımından Trakya İlkeren çeşidinde % 1'lik ve Flame Seedless çeşidi için % 0.75 ve % 1'lik dozların uygulanmasıyla sürgün uçlarının tümünde kuruma görülmüştür. Uygulama sürelerinin artışıyla her iki çeşitte de canlılık oranında düşüş saptanmıştır. En yüksek canlılık oranı 1 gün uygulamasından alınmış olup (Trakya İlkeren: % 69.2, Flame Seedless: % 50.0), bu uygulamayı 3 ve 5 gün uygulamaları izlemiştir. Her iki çeşitte de kolhisin doz ve süreleri arasındaki interaksiyon canlılık oranı bakımından önemli olmuş ve bu özellik açısından en yüksek canlılık oranı % 0.5'lik kolhisin dozunun 1 ve 3 günlük sürelerle uygulanmasından elde edilmiştir (% 100 ve % 93.3) (Çizelge 1).

Uygulama sonrası canlı kalan ve kuruyan sürgün uçları Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Uygulama Sonrası Canlı Kalan (Solda) ve Ölen Sürgün Uçlarına (Sağda) Ait Görünüm

Trakya İlkeren çeşidinde yaprak alanı kolhisin dozu ile uygulama süresi arasındaki interaksiyon önemli bulunmuştur. Trakya İlkeren çeşidinde tüm uygulamalar için en yüksek yaprak alan değerleri 1 gün süreyle kolhisin uygulamasından alınırken özellikle % 0.75' lik dozun 1 gün süreyle uygulanması bu bakımdan dikkat çekmiştir (240.3 cm²). Aynı çeşitte uygulama süresinin artışıyla yapraklarda

küçülme tespit edilmiştir. Flame Seedless çeşidi için % 0.5' lik kolhisin dozu yaprak alanının azalmasına neden olmuştur (% 0.5: 120.1 cm²). Trakya İlkeren çeşidinde gözlemlendiği gibi bu çeşitte de uygulama süresinin artışı yaprak alanında bir miktar azalmaya neden olmuş ancak, azalmanın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Trakya İlkeren ve Flame Seedless Çeşitlerinde Kolhisin Uygulamasının Yaprak Alanı Üzerine Etkisi (cm²)

Doz (%)	1. Gün		3. Gün		5. Gün		Ortalama	
	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless
0	183.6c	147.3	129.3d	144.0	112.7de	132.7	141.9ab	141.3a
0.5	218.0b	122.7	126.7d	121.3	91.5f	116.3	145.4a	120.1b
0.75	240.3a	-	93.4ef	-	57.7g	-	130.5b	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	214.0a	135.0	116.5b	132.7	87.3c	124.5		

LSD % 5 (Doz, Trakya İlkeren): 11.5
LSD % 5 (Doz x Süre, Trakya İlkeren): 19.9
LSD % 5 (Süre, Flame Seedless): 14.8

LSD % 5 (Süre, Trakya İlkeren): 11.5
LSD % 5 (Doz, Flame Seedless): Ö.D.
LSD % 5 (Doz x Süre, Flame Seedless): Ö.D.

Trakya İlkeren çeşidinde sürgün uzunluğu en yüksek değer kontrol uygulaması alınırken (126.1 cm) bu uygulamayı % 0.5 kolhisin uygulaması (71.8 cm) izlemiştir. Buna karşın en düşük sürgün uzunluğu değeri % 0.75 kolhisin dozunda belirlenmiştir (34.2 cm). Uygulama süresi bakımından genel ortalamalar değerlendirildiğinde süre artışıyla sürgün uzunluğu değerlerinde belirgin azalmanın olduğu görülebilmektedir. Trakya İlkeren çeşidinde sürgün

uzunluğu kolhisin dozları ile süreleri arasındaki ilişki istatistiki olarak önemli görülmüştür. En yüksek değeri (% 0.75'lik kolhisin dozu ve 5 gün süre uygulamasıdır (10.8 cm). Flame Seedless çeşidinde ise % 0.5'lik kolhisin dozu kontrol sürgün uzunluğundan (138.4 cm) belirgin bir azalmaya neden olmuştur (86.5 cm). Flame Seedless çeşidinde en kısa sürgünler % 0.5' lik kolhisin dozu ve 5 gün süre uygulanmasından elde edilmiştir (76.7 cm) (Çizelge 3).

Çizelge 3. Trakya İlkeren ve Flame Seedless Çeşidinde Kolhisin Uygulamasının Sürgün Uzunluğu Üzerine Etkisi (cm)

Doz (%)	1. Gün		3. Gün		5. Gün		Ortalama	
	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless
0	143.8a	132.5ab	141.3a	154.3a	93.3b	128.3b	126.1a	138.4a
0.5	73.3c	102.7c	81.7c	80.0cd	60.3d	76.7d	71.8b	86.5b
0.75	56.7d	-	35.0e	-	10.8f	-	34.2c	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	91.3a	117.6	85.9a	117.2	54.8b	102.5		

LSD % 5 (Doz, Trakya İlkeren): 6.2
LSD % 5 (Doz x Süre, Trakya İlkeren): 10.7
LSD % 5 (Süre, Flame Seedless): Ö.D

LSD % 5 (Süre, Trakya İlkeren): 6.2
LSD % 5 (Doz, Flame Seedless): 23.0
LSD % 5 (Doz x Süre, Flame Seedless): 24.0

Stoma sayısı Trakya İlkeren çeşidinde en yüksek değer kontrol (189 adet/mm²); en düşük değer ise % 0.75'lik kolhisin dozundan elde edilmiştir (108 adet/mm²). Uygulama süreleri arasındaki farklılık değerlendirildiğinde ise 3 ve 5 günlük kolhisin uygulamalarının 1 günlük uygulama süresine göre daha düşük stoma sayısına neden olduğu belirlenmiştir. Stoma sayısı kolhisin uygulamasının doz ve süre etkisini önemli bulunmuştur. Kontrol dışındaki uygulamalar arasında en yüksek

stoma sayısı 1 gün süreyle % 0.5 dozu uygulamasından; en düşük stoma sayısı ise 3 günlük süreyle % 0.75 kolhisin dozu uygulamasından elde edilmiştir (95 adet/mm²) Flame Seedless çeşidinde ise % 0.5'lik kolhisin dozunun uygulanmasıyla kontrole göre stoma sayısında belirgin bir azalma tespit edilmiştir (Kontrol: 179 adet/mm²; % 0.5: 148 adet/mm²). Süreler arasında ise en düşük stoma sayısı 155 adet/mm² değeri ile 5 günlük kolhisin uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Trakya İlkeren ve Flame Seedless Çeşitlerinde Kolhisin Uygulamasının Stoma Sayısı Üzerine Etkisi (adet/mm²)

Dozlar (%)	1. Gün		3. Gün		5. Gün		Ortalama	
	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless
Kontrol	179a	168	202a	196	185a	174	189a	179a
0.5	202a	151	13b	157	123bc	135	153b	148b
0.75	107cd	-	95d	-	123bc	-	108c	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	163a	160ab	144.0b	177a	144.0b	155b		
LSD % 5 (Doz, Trakya İlkeren): 15.3					LSD % 5 (Süre, Trakya İlkeren): 15.3			
LSD % 5 (Doz x Süre, Trakya İlkeren): 26.0					LSD % 5 (Doz, Flame Seedless): 15.0			
LSD % 5 (Süre, Flame Seedless): 18.0					LSD % 5 (Doz x Süre, Flame Seedless): Ö.D			

Her iki çeşidin stoma genişliğine en fazla % 0.75 kolhisin dozu uygulamasından elde edilmiştir. Trakya İlkeren çeşidinde uygulama süresi bakımından en yüksek stoma genişliği aynı istatistikî grup içinde yer alan 1 ve 3 günlük kolhisin uygulamalarından

alınmıştır (sırasıyla; 14.0-14.6 µm). Flame Seedless çeşidinde ise % 0.5'lik dozun uygulanmasıyla stoma genişliğinde kontrole göre önemli düzeyde bir artış sağlanmıştır (Kontrol: 8.2 µm; % 0.5: 11.9 µm) (Çizelge 5).

Çizelge 5. Trakya İlkeren ve Flame Seedless Çeşitlerinde Kolhisin Uygulamasının Stoma Genişliği Üzerine Etkisi (µm)

Dozlar (%)	1 Gün		3 Gün		5 Gün		Ortalama	
	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless
Kontrol	10.3	9.0	10.7	8.3	10.0	7.3	10.3c	8.2b
0.5	14.0	10.0	14.0	14.3	10.3	11.3	12.8b	11.9a
0.75	17.7	-	19.0	-	14.0	-	16.9a	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	14.0a	9.5	14.6a	11.3	11.4b	9.3		
LSD % 5 (Doz, Trakya İlkeren): 1.4					LSD % 5 (Süre, Trakya İlkeren): 1.4			
LSD % 5 (Doz x Süre, Trakya İlkeren): Ö.D					LSD % 5 (Doz, Flame Seedless): 2.5			
LSD % 5 (Süre, Flame Seedless): Ö.D					LSD % 5 (Doz x Süre, Flame Seedless): Ö.D			

Her iki çeşitte de stoma uzunluğu, ile stoma genişliği sonuçları birbirine paralellik göstermiştir. Trakya ilkeren çeşidinde en yüksek stoma uzunluğu % 0.75'lik kolhisin dozundan alınmıştır (28.4 μm). Süreler açısından en yüksek değer ise 3 günlük kolhisin uygulamasından elde edilmiştir (27.6 μm). Stoma uzunluğu bakımından doz ile süre arasındaki etkileşim önemli olmuştur. Buna dayalı olarak en

yüksek stoma uzunluk değerlerinin aynı grup içerisinde yer alan % 0.75'lik kolhisin dozunun 1 ve 3'er günlük sürelerle uygulanmasından elde edildiği belirtilebilmektedir (sırasıyla; 31.3 μm – 30.0 μm). Flame Seedless çeşidinde ise % 0.5' lik dozun uygulanmasıyla stoma uzunluğunda kontrole göre belirgin bir artış elde edilmiştir (Kontrol: 19.6 μm ; % 0.5: 23.5 μm) (Çizelge 6).

Çizelge 6. Trakya İlkeren ve Flame Seedless Çeşitlerinde Kolhisin Uygulamasının Stoma Uzunluğu Üzerine Etkisi (μm)

Dozlar (%)	1 Gün		3 Gün		5 Gün		Ortalama	
	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless	Trakya İlkeren	Flame Seedless
Kontrol	24.0bc	20.7	25.0bc	20.0	24.0bc	18.0	24.3b	19.6b
0.5	23.0c	23.0	27.7ab	24.3	25.0bc	23.3	25.2b	23.5a
0.75	31.3a	-	30.0a	-	24.0bc	-	28.4a	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
Ortalama	26.1ab	21.9	27.6a	22.2	24.3b	20.7		

LSD % 5 (Doz, Trakya İlkeren): 2.5

LSD % 5 (Doz x Süre, Trakya İlkeren): 3.7

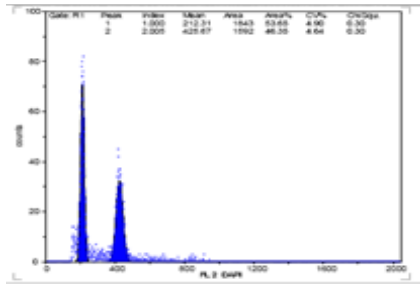
LSD % 5 (Süre, Flame Seedless): Ö.D

LSD % 5 (Süre, Trakya İlkeren): 2.5

LSD % 5 (Doz, Flame Seedless): 2.1

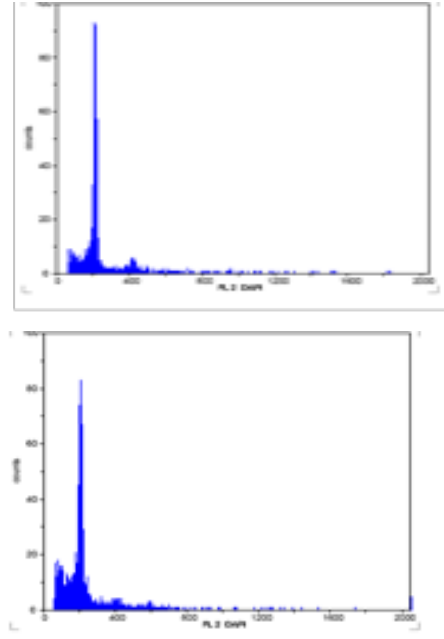
LSD % 5 (Doz x Süre, Flame Seedless): Ö.D.

Flow Sitometri analizi sonucuna göre, Trakya İlkeren çeşidinde gerçekleştirilen kolhisin uygulamalarından hiçbirinin ploidi seviyesini değiştirmedikleri belirlenmiştir. Flame Seedless çeşidinden elde edilen ploidi bulgularının ise Trakya İlkeren çeşidi sonuçlarına benzerlik gösterdiği; 1 gün süreyle % 0.5 kolhisin uygulamasının yapıldığı örneklerden yalnızca birinde mikzoploid ($2x+4x$) ploidi seviyesinin olduğu (yaklaşık % 45 hücresi tetraploid ($4x$)) saptanmıştır. Ancak ploidi analiz sonuçlarına dayalı olarak genel anlamda kolhisin uygulama doz, süre veya yönteminin etkili olmadığı düşünülmüştür. Trakya İlkeren çeşidi örneklerinden elde edilen ploidi grafiği Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Trakya İlkeren (Solda) ve Flame Seedless Çeşidinde (Sağda) Kolhisin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Diploid ($2x$) Örnek Grafiği

Flame Seedless çeşidinden elde edilen $2x$ ve $2x+4x$ ploidi düzeyini ifade eden grafik (Şekil 4) aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4. Flame Seedless Çeşidinde Kolhisin Uygulaması Sonucu Elde Edilen Mikzoploid ($2x+4x$) Örnek Grafiği

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada arazi şartlarında sürgün uçlarının kolhisin çözeltisine batırılmış pamukla muamele edilmesi tekniğinin kontroldeki canlılık oranının yüksekliği açısından uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Trakya İlkeren çeşidi için % 1; Flame Seedless çeşidi için ise % 0.75 ve % 1 dozlarının sürgün uçlarının tamamının kurummasına neden olduğu saptanmıştır. Her iki çeşit için de canlı sürgün ucu oranı açısından kontrole en yakın sonuçlar % 0.5' lik kolhisin dozunun 1 ya da 3 günlük sürelerle uygulanmasından elde edilmiştir. Trakya İlkeren çeşidinde % 0.75'lik dozun 3 ve 5 gün süreyle uygulanmasında ise canlılık oranının % 50' nin altına düştüğü gözlenmiştir. Rassoulli ve Mahmoodzadeh (2005) ise Bidaneh üzüm çeşidinde değişik süre (24, 48, 72 ve 96 saat) ve konsantrasyonlardaki (% 0.1, % 0.3, % 0.5, % 0.7, % 0.9 ve % 1.1 dozları) kolhisin uygulamalarından en üstün sonuçları % 0.9 ve % 1.1 dozlarındaki kolhisinin 96 saat süreyle uygulanmasından elde etmişlerdir. Araştırmacıların tavsiye ettikleri dozlar kullanılan her iki çeşit için de öldürücü etkiye sebep olmuştur. Luo ve ark. (1995) ise Hamburg Misketi çeşidinin tetraploid mutantlarını, % 0.2 dozundaki kolhisin çözeltisinde 45 gün gibi uzun sürelerde muamele ile elde etmişlerdir.

Kolhisin uygulama doz ve sürelerinin artışına bağlı olarak her iki çeşitte de yaprak alanı ve sürgün uzunluğu değerlerinde azalma dikkati çekmiştir. Farklı araştırmacıların çalışmalarında tetraploid bitkilerin diploidlere kıyasla daha iri yapraklara sahip olduğu bildirilmiştir (Rose ve ark., 2000; Motosugi ve ark., 2002; Yang ve ark., 2006). Yapılan bu çalışmada da Trakya İlkeren çeşidi için % 0.5 ve % 0.75'lik dozlardaki kolhisinin 1 gün süreyle uygulanmasıyla kontrole göre daha iri yaprak oluşumu sağlanmıştır, ancak bu artışın ploidi düzeyinin artışında etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Diploid ve tetraploid bitkilerdeki morfolojik farklılıkların incelendiği çalışmalarda; tetraploid bitkilerin sürgün uzunluğunun diploid olanlara göre daha kısa; boğum aralarının ise daha dar olduğu bildirilmiştir (Rose ve ark., 2000; Motosugi ve ark., 2002). Bu çalışmada kontrol uygulamasına kıyasla en düşük sürgün uzunluk değeri, Trakya İlkeren çeşidinde % 0.75'lik kolhisin dozunun 5 gün süreyle uygulanması (10.8 cm) ve Flame Seedless çeşidinde 5 gün süreyle % 0.5 kolhisin dozunun uygulanması (76.7 cm) ile sağlanmıştır.

Çalışmada kolhisin uygulamasının stoma yapıları üzerine etkisi açısından da değişiklikler tespit edilmiştir. Özellikle dozların artışına bağlı olarak stoma sayısında azalma; stoma genişliği ve uzunluğunda artış saptanmıştır. Diploid ve tetraploid bitkilerin stoma sayılarının karşılaştırıldığı çalışmalarda ploidi seviyesinin artışıyla yapraktaki stoma yoğunluğunun azaldığı, stoma boyutunun arttığı bildirilmiştir (Motosugi ve Motioka 2001; Motosugi ve ark., 2002; Yamane ve Kurihara, 1980; Yang ve ark., 2006). Değişik araştırmalarda stoma ve ploidi düzeyi arasındaki bildirilen bu ilişki dikkate alındığında her iki çeşit içinde bazı uygulamalarla ploidi düzeyinin değiştiği düşünülmüştür. Bazı kolhisin dozlarının stoma yönünden etkisi değerlendirildiğinde alınan yaprak örneklerinin flow sitometrik incelemeleri sonucunda bir örneğin % 50 hücresinde $2x+4x$ yapısı görülmüş; bunun dışındaki tüm örneklerde diploid yapının devam ettiği tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- Aihong, M., Parga, F., JIarshe, S., Shaohua, L., 2005. Study on The Induction of Tetraploid Grapes. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(8): 1645-1651.
- Akal, N., 2001. Değişik Vitis Türleri ve Melezlerinin Vejetatif Organları Arasındaki Bazı Anatomik Farklılıkların Belirlenmesi. Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst. Yüksek Lisans Tezi, 71 s
- De Schepper, S., Leus, L., Mertens, M., Van Bockstaele, E., De Loose, M., Debergh, P., & Heursel, J. (2001). Flow cytometric analysis of ploidy in *Rhododendron* (subgenus Tsutsusi). *HortScience*, 36(1), 125-127.
- Köksal, N., 1999. Haploid Kavun Bitkilerinde in vivo ve in vitro Yöntemlerle Dihaploidizasyon. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi., 116 s.
- Luo, Y.W., Qaco, Z.J., Zhu, Z.Y., Huangpu, Z.S., Cheng, J.H., 1995. Study on The Induction of A Tetraploid Mutant From Diploid Grape Cultivar Muscat Hamburg By Treatment With Colchicine. *China Fruits*. 2: 5-7.
- Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D., Naruo, T., 2002. Comparison of Growth Characteristics Between Diploid and Colchicine- Induced Tetraploid Grape Rootstocks. *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science*.71(3): 335-341.
- Motosugi, H., Motioko, R., 2001. Tetraploid Breeding of Wild Grapes Native to Japan. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52(3): 282-285.

- Notsuka, K., Tsuru, T., Shiraishi, M., 2000. Induced Polyploid Grapes Via 'In Vitro' Chromosome Doubling. *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science*. 69(5): 543-551.
- Park, S., Wakana, A., Hiramatsu, M., Uresino, K., 2002. A Tetraploid Hybrid Plant From 4x X 2x Crosses in *Vitis* and its Origin. *Euphytica*, 126: 345-353.
- Rassouli, V.A., Mahmoodzadeh, H., 2005. Induced Mutation in Grape (*Vitis vinifera* var. Bidaneh) by Using Colchicine. *International Workshop on Advances in Grapevine And Wine Research*, 15-17 September, Venosa (Italy). 26 p.
- Rose, J.B., Kubba, J., Tobutt, K.R., 2000. Induction of Tetraploidy in *Buuleia Globosa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 63: 121-125.
- Yamane, H., Kurihara, A., 1980. Studies on Polyploidy Breeding in Grapes. II. Polyploid Induction by Colchicine Application. *Bulletin of The Fruit Tree Research Station, E (Kaju Shikenjo Hokoku, E)*. 3: 1-13 s.
- Yang, X.M., Cao, Z.Y., An, L.Z., Wang, Y.M., Fang, X.W., 2006. In Vitro Tetraploid Induction via Colchicine Treatment From Diploid Somatic Embryos In Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*. 152: 217-224.